

Title	尿中中性17-KetosteroidsのPolarograph的定量的研究 第1篇 :尿中中性17-KetosteroidsのPolarograph的定量法及び健康人の尿中中性17-Ketosteroidsの排泄値
Author(s)	玉置, 明
Citation	泌尿器科紀要 (1959), 5(12): 1185-1196
Issue Date	1959-12
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/111879">http://hdl.handle.net/2433/111879</a>
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

# 尿中中性 17-Ketosteroids の Polarograph 的 定 量 の 研 究

第 I 篇 尿中中性 17-Ketosteroids の Polarograph 的定量法及び  
健康人の尿中中性 17-Ketosteroids の排泄値

京都大学医学部泌尿器科教室（主任 稲田 務教授）

助 手 玉 置 明

## A Study of the Polarographic Quantitative Analysis of the Urinary Neutral 17-Ketosteroids

### I. The Method of the Polarographic Quantitative Analysis of the Urinary Neutral 17-Ketosteroids and the Rate of Urinary Excretion of the 17-Ketosteroids in Normal Healthy Male

Hajimu TAMAKI, M. D.

*From the Department of Urology, Kyoto University Medical School*

*(Director : Prof. Tsutomu Inada, M.D.)*

Kyoto, Japan

There have been colorimetric and polarographic methods in chemical quantitative analysis of urinary 17-KS. In colorimetric quantitative analysis of urinary 17-KS, the total neutral fraction contains, in addition to the 17-KS, a number of other steroids, nonsteroids, and nonspecific chromogens some of which give the same type of color reaction as the 17-KS and thus interfere the determination, while polarographic quantitative analysis first described by Wolfe in 1940 is the specific method of microquantitative analysis for urinary 17-KS, in which Wolfe obtained polarogram of 17-KS by Girard's derivative produced by Girard's T reagent. On the basis of Wolfe's method, it has been intended by the author to improve the method of extraction of 17-KS and the polarographic procedure by referring to Barnett's and Kimoto's methods, and the author has devised the simple polarographic method for microquantitative analysis of urinary 17-KS. The rate of excretion of urinary 17-KS has been estimated by this method with 20 cc in total daily output of urine on 58 normal healthy males.

1) As urine sample, 20 cc in total daily output was used for polarographic analysis of 17-KS and polarogram for 17-KS whose amount was equivalent to that in 10 cc was obtained.

2) During the procedure for extraction of 17-KS, the total residue was washed with dilute aqueous alkali, 9%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -10% NaOH which solutions were made by Barnett.

3) During the polarographic procedure, the total volume of the final assay treated

with alcohol+Girard's T reagent, 0.05 cc+H<sub>2</sub>O, 1.0 cc was utilized and to this 1.0 N of NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 cc and 0.5 N of NaOH, 1.0 cc were added, from which polarogram was obtained.

4) The standard was obtained by the Standard Addition Method employing androsterone.

5) Among 58 cases of normal healthy males whose ages ranged between 10 and 69 years, the average of the excretion range in 45 cases ranging 16-49 years of age was 10.5 mg/day (5.4 mg-18.7 mg/day).

6) The excretion range, the average value, and the standard deviation were obtained in each age group in order to determine the daily urinary excretion standard of 17-KS by means of the author's method.

## I 緒 言

副腎皮質ホルモン或は脳下垂体・副腎皮質系に関する研究は近年特に目覚しく、就中、中性 17-Ketosteroids (以下 17-KS と略記する) に関しての基礎的及び臨床的報告は内外を問わず枚挙に暇が無い。

尿中に排泄される 17-KS は或るものは Androgen 物質として性腺に由来し、或るものは C<sub>21</sub> Steroid の Endoprodut として副腎皮質に由来しているところの C<sub>17</sub> 位に Co 基を有する Steroid の総称である。従つて尿中 17-KS 総量及びその各分割を分離測定する事は Steroid 代謝の消長、並びに性腺副腎皮質系の機能を知る一つの示標として幾多の研究者により試みられ、臨床的診断及び治療に応用せられている。

尿中 17-KS の定量法は大別して生物学的定量法と化学的定量法に別けられる。後者は更に呈色反応と Polarograph 法の 2 方法に別けられる。呈色反応は Zimmermann 反応及び Pincus 反応を応用せる 2 方法がある。その中で最も広く行われている方法は Zimmermann 反応の応用であつて、Callow, Haltorff, Drechter, Pearson 等の方法、三宅改良法、Drekter-大野変法、等と多数の方法が報告されている。而しこれら比色法による尿中 17-KS 定量に際しては、同時に存在する 17-KS 以外の非ケトン性 Steroid 或は Chromogen による呈色の干渉が問題となつている。この為に Fraser の補正式が必要とされている。後者の Polarograph 法は 1940 年 Wolfe により提唱され、

その後 Barnett, Talbot, 木本等により研究せられ多少改良が加えられており、所謂 Polarograph 的に不活性な 17-KS の Co>基C=O に Trimethyl acetohydrazide ammonium Chloride (Girard T 試薬) を反応せしめ、之を活性な >C=NL 基にかえ、この電解還元電流電圧曲線を得る事による、尿中 17-KS の特異的な微量定量法である。更に 1953 年 M. Brezina 等は Diethylaminopropionic acid hydrazide を用いた Polarograph 的定量法を報告した。

著者は尿中 17-KS の化学的定量法が種々諸家により検討吟味されている今日、その抽出法を過去の Polarograph 法に加味して、Diethylaminopropionic acid hydrazide は入手困難のため、本邦では入手容易なる Girard T 試薬を用い、且つ最終の Polarograph 的操作における基礎液緩衝液濃度に改良を加え、被検試料を最大に活用し、簡便にして且つ微量定量に適する如く種々検討を加えて、成人尿中 17-KS 排泄値の総量及び分割測定に便なる Polarograph 法を工夫したいと思ひ次の研究を行つた。

## II 測定法

### (1) 試 薬

エチルエーテル

純エチルアルコール

氷醋酸

9%炭酸ソーダ水溶液

10%苛性ソーダ水溶液

0.5 n 苛性ソーダ水溶液

1.0 n 塩化アンモン水溶液

10%チオ硫酸ソーダ 10%苛性ソーダ水溶液、使用当日に新製する。

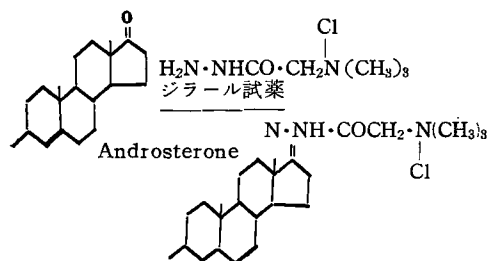
以上諸薬品は何れも試薬用特級を用いる。

Girard T 試薬; Trimethyl aceto hydrazide ammonium Chloride 100mg/1.0cc 氷醋酸溶液を2日毎に新製する。

androsterone 標準液; androsterone 1.0mg/1.0cc エチルアルコール溶液を保存液とし、その 0.1cc を 0.1mg として使用する。

## (2) 測定基本操作

androsterone 標準液の適当量を小試験管 (1.5cm × 9.5cm) にとり 60°C 恒温乾燥器に入れ蒸発せしめ、その乾固物に Girard T 試薬 0.05cc を加え、コルク栓で密栓し2分間煮沸後直ちに冷却する。かくして得たものは androsterone の C<sub>17</sub> 位の Co基が Girard T と置換された水溶性化合物であつて、このものは電解還元可能である



(表 1)

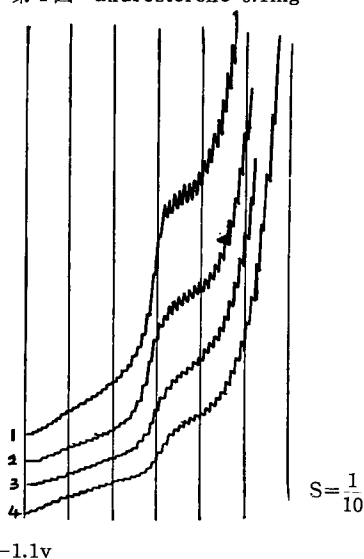
次で之に 1.0cc の蒸留水を加え、更に 1.0nNH<sub>4</sub>Cl, 0.5nNaOH 各 1.0cc 宛加え、よく振盪撹拌する。これを Polarograph 用電解瓶に移し15分間水素を通気して溶存酸素を完全に除去し、法に従つて -1.0V より -1.7V の間において電解電流電圧曲線を撮影する。尚電解還元は 20°C ± 2°C 陰極水銀の滴下速度は 3 秒 1 滴、平均水銀滴下重量 6.0mg とした。使用した Polarograph は柳本製自記記録式ポーログラフ (visibe-recording Polarograph) を用い検流計は感度最高 0.4μA/mm の 1/2~1/50 に下げて用いた。かくして得られた Polarogram は第 1 図であつて、即ち 17-KS の電解還元波は -1.35V ~ -1.4V に表われ、やがて飽和電流を示すが未反応のまま残つてゐる Girard T の還元波は -1.55V ~ -1.65V に表われて来るので 17-KS の定量には妨げとならない。

## (3) 被検試料及び水解抽出法

被検尿; Polarograph 法による尿中 17-KS の定量法を初めて提唱した Wolfe は被検試料として 1l の

尿を用い、Barnett 等は 1 日尿量の 1/15 とし、木本

第 1 図 androsterone 0.1mg



No	1.0nNH <sub>4</sub> Cl	0.5nNaOH	H <sub>2</sub> O	電解液量
1	1.0cc	1.0cc	0cc	3.05cc
2	1.0	1.0	2	5.05
3	1.0	1.0	4	7.05
4	Wolfe 木本法			5.00

は小児領域において 60cc を使用した。著者は被検尿を更に少くし、Polarograph 法を微量定量法として意義づける事に着目して、尿 20cc/1 日量中を使用した。

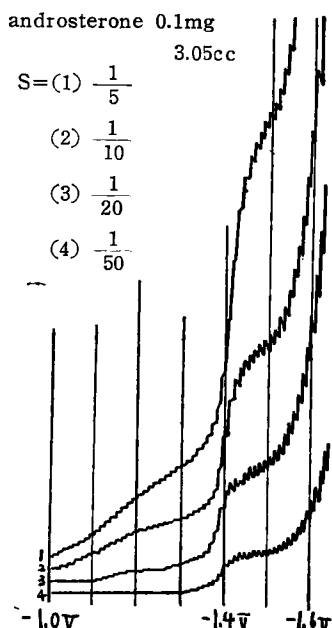
水解と抽出法; 三宅, Drekter- 大野, Barnett,

木本等の方法を取入れ新しく抽出法を修正した。即ち被検24時間尿を測定し、其の 20cc を 100cc 容量のフラスコにとり、之に濃塩酸 6cc を加えて共栓をし、重湯煎にし、80°C 10分間加熱水解する。水解後直ち冷却し、本液を分液漏斗にとり 40cc のエルチエーテルにてフラスコを洗滌して之を分液漏斗に注加し3分間一定速度で温和に振盪抽出し、エーテル分に 9% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10% NaOH 及び 10% チオ硫酸ソーダ-10% NaOH 溶液を各 20cc 順次注加振盪洗滌を行い Phenol 分割、色素及び被還元物質を除去する。更に蒸留水 20cc で水洗し残つたエーテル分中 25cc をとり減圧乾固せしめ、乾固物を 2.5cc の純エチルアルコールに溶解する。その 2.0cc を小試験管にとり 60°C 恒温乾燥器中にて蒸発後、(2)に準じて Polarogram を得る。

## (4) 校正曲線の作製及び 17-KS 1日排泄量の算定

Wolfe 等は尿抽出中には 17-KS と共に夾雑物が共存するため、これらの物質が 17-KS の波高に影響する事をのべた。ここに各種既知量の androsterone 標準液を(2)に準じて Polarogram を得、更に感度を変化させた場合の androsterone の濃度波高との関

第2図 感度と波高の関係



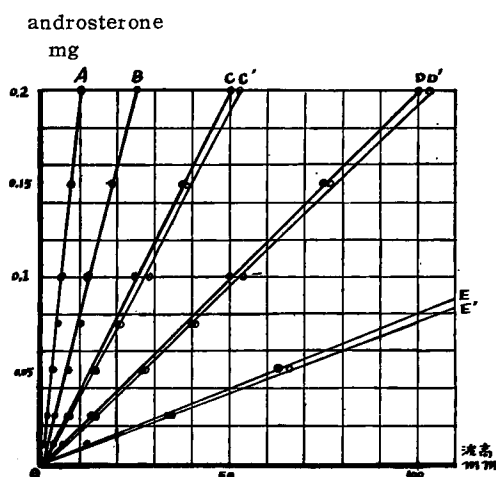
係を示すと第2図及び第3図 ABCDE の如くである。而しこれは純粋の androsterone の濃度波高曲線であつて、尿中17-KS量を求める場合に標準曲線として使用する事が適当でない。著者は標準曲線として所謂標準体添加法 (Standard addition method) を用いた。本法による誤差は±1.5%以内であると言われている。即ち一定量の尿抽出物に各種既知量の androsterone 標準液を加へて校正曲線を次の如くに作製した。

尿 40cc エチルエーテル 80cc 各種洗滌液を各倍量として(3)に従い水解抽出し、抽出乾固物を 5cc エチルアルコールに溶解し、これを 2cc 宛 2本の試験管にとり、次にその内1本に既知量の androsterone 標準液を添加し、乾燥後(2)に従い両者の Polarogram を得、この2つの波高の差を求めて androsterone 濃度と波高との関係を図示すると第3図 C',D' の如くであつて、C',D' は C,D より夫々高い値を示している、著者は実際に最も必要な androsterone 0.2mg 迄の濃度波高曲線を図示したが、androsterone 波高は

0.5mg 迄の濃度では実際正比例していると言え、0.6mg 以上になると拋物線状を示す事を知つた。本木はこの直線 (C',D') を校正曲線と名付けているので著者も之を校正曲線と呼称する。

ここでこの校正曲線が尿中 17-KS 量を androsterone に換算して測定するための標準曲線とし、これにより1日排泄量は次の如くに計算した。

第3図 校正曲線



mg	D	D'	S:
0.025	13.0	13.5	A $\frac{1}{50}$
0.050	25.5	26.0	B $\frac{1}{20}$
0.075	39.5	40.5	C $\frac{1}{10}$ C' $\frac{1}{10}$
0.100	49.5	53.5	D $\frac{1}{5}$ D' $\frac{1}{5}$
0.150	74.0	76.5	
0.200	100.0	103.0	E $\frac{1}{2}$ E' $\frac{1}{2}$

$$17\text{-KS 1日排泄量} = A \times \frac{U}{V}$$

U=24時間尿量 (cc)

V=定量に用いられた尿量

$$= 20\text{cc} \times \frac{25}{40} \times \frac{2.0}{2.5} = 10\text{cc}$$

A=被検試料 (尿量 10cc に相当) 中の androsterone の mg 数に換算した 17-KS 量

## (5) 回収実験

同一被検尿 20cc 2つの内1方に既知量の androsterone 標準液を添加し、両者を(3), (2)に従い水解抽

出 Polarogram を得、この両者の波高の差を校正曲線に照して添加 androsterone の濃度に換算して回収値とした。その成績は第 2 表の如くであつて誤差平均%は  $\pm 3.30\%$  である。

第 2 表 回収実験成績表 (androsterone)

番号	添加せる androsterone $\gamma$	試料中の androsterone 濃度計算値 $\gamma$	測定値	回収率
1	25	12.5	13.0	103.7
2	50	25	23.5	94.2
3	50	25	24.0	96.1
4	100	50	51.0	102.0
5	100	50	49.5	99.4
6	150	75	73.5	98.8
7	200	100	103.5	103.5
8	200	100	95.5	95.6
9	300	150	146.5	97.8
10	400	200	190.0	95.0

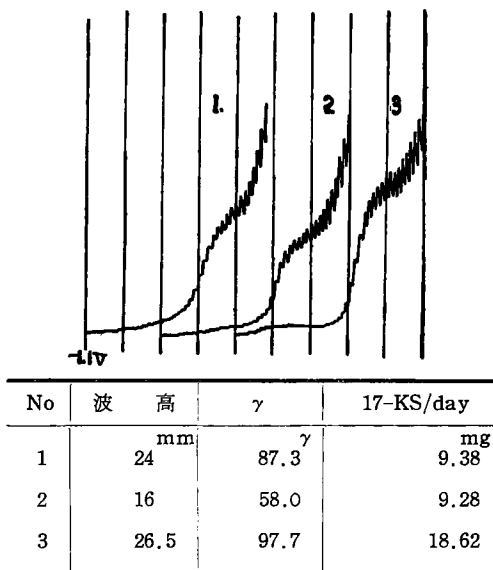
### III 健康人の測定値

著者は本法により健康男子10才～69才合計58名について1日排泄量を測定し、それを年齢別に区分して第3表に示した。同一年令群内に於ても可なり大きい排泄量動揺範囲があり、亦16才を過ぎると急激に増加の傾向を示し、30才～35才にて最高に達し、その後年令と共に減少している。16才～49才、45例の平均値は10.5mg/day 分布範囲は5.4～18.7mg/day である。第4図は23才、24才、34才の健康男子の Polarogram である。

第3表 健康者尿中性 17-KS 値 (mg/dan)

性別	年 令	例数	平均値	分 布	標準偏差
♂	10～15	5	4.0	2.6～5.7	$\pm 1.25$
♂	16～19	15	8.1	5.4～12.4	$\pm 2.42$
♂	20～29	15	11.2	7.3～18.5	$\pm 2.59$
♂	30～39	10	14.3	8.4～18.7	$\pm 2.73$
♂	40～49	5	10.2	6.3～14.2	$\pm 3.05$
♂	50～59	5	9.5	6.6～12.1	$\pm 2.27$
♂	60～69	3	7.2	5.5～9.8	$\pm 2.25$
♂	16～49	45	10.5	5.4～18.7	

第4図 健康者 17-KS



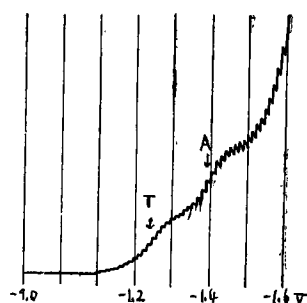
### VI 考 察

1935年 Zimmermann が最初に尿中より分離せる androsterone が KOH の存在のもとに、m. dinitrobenzene と反応して赤色の呈色物質を生ずる、所謂 Zimmermann 氏呈色反応による尿中 17-KS 比色定量を可能ならしめて以来、諸実施者により尿エキスの抽出法及び比色法の細かい諸点にわたり研究実施が試みられ、この方法が簡単で短時間で出来る特点を有する事で現在最も広く臨床的に応用せられている。而しこの Zimmermann の呈色反応は Androgen それ自体でなく、活性-CH<sub>2</sub>-群を有する Ketosteroids の測定であるが、事実上之によつて性腺や副腎皮質機能の消長を窺い得るものである。

この比色法とは全く別方法である Polarograph 法を初めて発表したのが Wolfe(1940年)であつて、これに先立ち、Eisenbrand が Polarograph 的に KS のうち共軛系をもつ3-KS である Testosterone, Progesterone, Corticosterone 等は 0.1N LiCl 溶液で -1.7V に半波電位をもつ還元波を示すが、共軛系をもたない 17-KS である androsterone は還元波を示さない事を報告した。次いで Wolfe, Hershber-

g, Fieser 等がこの還元波を示さない 17-KS に Girard T 試薬 ( $\text{H}_2\text{N}-\text{NHCO}-\text{CH}_2\text{N}-\text{CL}(\text{CH}_3)_3$ ) Trimethyl acetohydrazide ammonium Chlorid を作用せしめ、Polarograph 的に不活性なる 17-KS のケント基  $>=\text{C}=\text{O}$  を可溶性、電解還元可能な所謂活性は  $>\text{C}=\text{NL}$  基にかへ、Polarogram を得る事により尿中 17-KS の微量定量に成功した。この際 Testosterone, Progesterone, Corticosterone なる不飽和 3-KS も Girard T 試薬により還元波を示すが、その電解電圧は  $-1.25\text{V}$  であり、17-KS の  $-1.4\text{V}$  と異なり、これ等両液は互に干渉せず、17-KS と 3-KS の混合液を電解して

第 5 図



androsterone 50 $\gamma$ +Testosterone

$$75\gamma/3.05\text{cc } S = \frac{1}{20}$$

も明瞭なる 2 段波として現われる事を発表した。第 5 図は androsterone 50 $\gamma$  と Testosterone 75 $\gamma$  を混合せる液の Polarogram であつて、明瞭なる 2 段波を形成する事が判る。

尿中に排泄される 17-KS は Testosterone が androsterone, etiocholanolone, として代謝される事は Dobriner, Dorfman 等により明らかにされている様に、或るものは性腺に由来し、或るものは副腎に由来している  $\text{C}_{17}$  位に  $\text{Co}$  基を有する中間代謝乃至終末廃棄物として尿中に見られる Steroid の総称であつて、その主なるものは androsterone, dehydroisoandrosterone, isandrosterone, etiocholanolone 等である。Wolfe 等はこれ等 17-KS の同一濃度のものについて Polarogram をとり、各々の分子量と波高との関係を検討し、分

子量が違つても波高が変らない事も報告している。

この Polarograph 的定量法を比色法と比較した場合、比色法における呈色は Androgene それ自体でなく活性  $-\text{CH}_2-$  群を持つ KS の測定であつて、従つて 17-KS 以外の非ケント性 Steroid が呈色に干渉し、その為標準線と比べ理論的に誤差を来すので吸光度補正に Fraser の補正式を必要とするに比べ、この点からして Polarograph 法は尿中 17-KS の理論的には全く特異的定量法であると言われねばならない。而しその操作及び要する時間が比色法に比し複雑且つ長時間を要する点で、今日迄余り省みられなかつた方法である。1946 年 Barnett, Henly, Batt, Morris, 1955 年木本等により尿エキス抽出法及び Polarograph 的操作に改良が加えられた。即ち Barnett 等は 17-KS 抽出法として過マンガン酸カリ液、9% 炭酸ソーダ水溶液を夫々使用し、還元物質除去法を考案し、木本は Drecker, Barnett, 三宅の方法を抽出法に取入れ、Polarograph 的操作に Wolfe の方法を用いて改良法を実施し、これを小児領域における臨床に応用した。亦 1953 年 M. Brezina, V. Volkova, J. Vilke 等により Diethylaminopropionic acid hydrazide を Steroid に結合させて hydrazone とし、0.2 n 苛性ソーダ 0.5 n 塩化ナトリウム電解液中で 17-KS を測定し、Girard T 試薬を使用した場合より遙かに微量の 17-KS の検出される事を報告している。著者は Wolfe, Barnett, 木本等による Polarograph 的 17-KS 定量法が臨床的に総量及び分割分離測定に応用するためには余りにも被検試料多量を要し、且つ Polarograph 的操作が複雑である事を思い、3 者の方法を基礎にして、Diethylaminopropionic acid hydrazide が本邦にて入手困難のため、本邦にて入手容易なる Girard T 試薬を使用し、微量定量に適する如くに改良法を前述の如く考案するに当り次の如く実験検討を行つた。

被検試料；木本は 1 日尿中 60cc の試料を用い実際測定には 25cc 相当量中の 17-KS の波高を求めたが、著者は試料を 20cc とし 10cc

相当量の 17-KS 波高を測定する様改良し、成人値測定を行つた。三宅, Drechter-大野変法等は試料 10cc を用い 5cc 相当量中の 17-KS を比色法にて行のてているが、Polarograph 的定量法においてはエチルエーテル抽出後、エーテル層を 9%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液及び 10%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/10\% \text{NaOH}$  溶液にて 2 回の洗滌法を余分に行い、その過程においてエチルエーテルの漏出が多いため測定誤差を来し易いので、比色法より多量を必要と認め、尿 20cc を用いた。

水解と抽出法；17-KS の臨牀的測定法の基礎的条件として、古来より水解法に対する吟味検討が種々諸家により研究されている。1935年 Butenandt, Dannenbaum が 3 $\beta$ -hydroxy 17-KS 就中 dehydroepiandrosterone が水解に當つて構造破壊、基転換を起し易い事を報告以来、1938年 Dingemans, Peterson 等は塩酸加熱水解によつて生ずる脂溶性の androgenic の物質は水解の時間を長くすると却つて少くなると言い、亦水解により消失するのは  $\beta$  分割において著しく、生物学的活性も低下する事を報じた。水解法で 3-Chloro- $\Delta^5$ -androstene-17-one, i-androstenolone 等人工産物として生成される事が知られ、従つて水解法として塩酸加熱水解にとつて変り、水解と抽出を同時に行う塩酸クロロホルム同時水解抽出法 (Talbot 1940) が考案され、その他にブタノールエキス  $\text{BaCl}_2$  水解法 (Talbot 1943), エタノール  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (P.H.10), 室温長期水解法 (Lieberman 1948), ブタノールエキス acetate Buffer 水解法 (Bitman, Cohen (1951)) Tensen, Tötterman 2 段階水解法 (1952) dioxan 水解法 (Cohen, Oneson (1953)), Sulfatase 水解法 (Roy 1956) 等数多くの改良法が遂年のに報告されており、大野 (1959) が主なる方法について追試吟味検討し、詳細な報告を行つてゐる。

著者は Drechter-大野変法に習い、尿 20cc に塩酸 6cc, 80°C, 10 分間加熱加水分解法を用いた。抽出法は簡便迅速、回収率のよい Drechter のエチルエーテル法を用い、抽出したエーテル層

の洗滌は 木本 の行つた如くに、Barnett の考案せる 9%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/10\% \text{NaOH}$  水溶液を用いた。比色法に比較するとこの 2 回の洗滌が余分の操作であるが、還元物質除去及び Girard T 試薬に可溶性とする為には必要なよい方法である事を認めた。

エーテル層乾固物のアルコール処理；エーテルエキス乾固物を直接呈色反応に応用し得る比色法に比較した場合、本法においては Polarograph 的操作を行う際、0.05cc Girard T 試薬に溶解させねばならない。そのためには 25cc エーテルエキスを出来るだけ小さい面に蒸発乾固させねばならない。このため特別の蒸発用試験管を作製使用しても、僅かの Girard T 試薬に溶解せしめる為には余りにも広面積に過ぎる為、純エチルアルコールに一度溶解せしめ、小試験管に再度乾固物を作製させねばならない。著者はエーテル乾固物を 2.5cc のアルコールに溶解せしめ、その 2.0cc をとり、アルコール乾固物を作製する様改良した。

Polarograph 的操作；第 4 表に示す如く、Wolfe は尿のアルコール抽出液を減圧濃縮し、油状物質に Girard T 試薬 0.05cc を加え 2 分間 100°C の湯浴後冷却し、水 0.95cc を加える。この液 0.25cc に 0.5n  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5cc 及び 0.2n  $\text{NaOH}$  0.625cc を加え、更に水 1.125cc を加えて全体を 2.5cc となし、これを電解液として Polarogram を撮影した。木本は Wolfe 法を総て倍量とし電解液 5cc にて Polarogram を得た。以上の如く水解抽出による最後の 17-KS アルコール抽出乾固物に Girard T 試薬及び水を加注せる全量 1.0cc 中より Polarograph 的操作に移る段階において、Wolfe はその 1/4 量 (0.25cc), 木本は 1/2 量 (0.5cc), を分割使用している。而しこれは誤差を防ぐためのものとは考えられない。従つて全量 (1.0cc) を使用し Polarogram を得る事が、試料を少くし操作を簡略化する上に望ましい事と考え、著者は Wolfe 法を基礎に種々検討を加え、その結果抽出物 Girard T 試薬液に加える水の量を 1.0cc と改め、その全量 (1.05cc) に添加する  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を、1.0n  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1cc



となし、緩衝能を大にする為、次に加える NaOH を 0.5n 1.0cc と改め、電解液 3.05cc PH 5.0 とし、前 2 方法に比し Polarograph 的操作を行うに際し、著しく簡略化して Polarogram を作製した。第 1 図(1), 第 2 図は androsterone 0.1mg 標準液を使用した Polarogram であつて、第 1 図(4)の Wolfe- 本本法により得た Polarogram と比較した場合、同一試料を使用した時、理論的に倍量の 17-KS 相当波が得られ、実際に波高の測定に便なる事を知った。従つて試料の減量を可能ならしめると同時に微量定量により利点を備えているものと

思われる。

次に本法を考案せる過程及び有機 Polarograph として本法を検討せる結果について述べる。

一般に有機 Polarograph 実験においては第一に PH1~13 の緩衝液中での半波電位、波形、波高、波の数を観測するのが原則で、その中より最も測定し易い波形を呈する範囲を求め、この PH で濃度と波高の関係をしらべる事が順序とされている。

Wolfe は第 4 表に示した方法と、その基礎液に  $H_2O$  1.75cc,  $H_2O$  1.50cc + 0.1nHCl 0.25cc,

第 4 表

	最終 乾固物	基礎液		緩衝液		電解液
	GirardT H <sub>2</sub> O cc	→検体	+ <sup>n</sup> NH <sub>4</sub> Cl cc	+ <sup>n</sup> NaOH cc	+ H <sub>2</sub> O cc	総量 PH
Wolfe	"	→0.25	0.5 <sub>n</sub> + NH <sub>4</sub> Cl 0.5	0.2 <sub>n</sub> + NaOH 0.625	+ 1.125	2.5
	0.05					5.2
	0.95					
Wolfe 本本	"	→0.5	0.5 <sub>n</sub> + NH <sub>4</sub> Cl 1.0	0.2 <sub>n</sub> + NaOH 1.25	+ 2.25	5.0
	0.05					5.2
	0.95					
本 法	"	→1.05	1.0 <sub>n</sub> + NH <sub>4</sub> Cl 1.0	0.5 <sub>n</sub> + NaOH 1.0	(—)	3.05
	0.05					5.0
	1.00					

$H_2O$  1.25cc + 0.1nHCl 0.5cc を加えた、4 つの Polarogram を示し、原法の最適なる事を述べている。尿エキス + Girard T 試薬 +  $H_2O$  液全量で Polarograph 的操作を行う場合、Wolfe 本本法に準じると、本本法の緩衝液を総て倍量にするとよい。而し電解液量 10cc となるため、先ず基礎液となるべき本本法の 0.5nNH<sub>4</sub>Cl はその倍濃度の 1.0n NH<sub>4</sub>Cl 1.0cc となし、之を加えて基礎液とし、次に緩衝液 0.2nNaOH は 0.5n NaOH 1cc と高濃度とし 1cc を添加した。更に添加すべき水の量は彼等の方法に従えば 5cc となり電解液量 8.05cc となる。

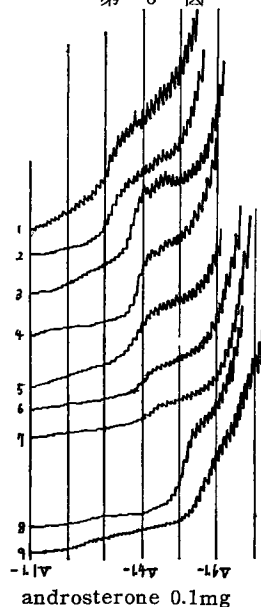
著者は之等に基づいて先ず 0.4nHCl, 0.5nNaOH,  $H_2O$  を用いて PH1, 3, 5.2, 8.6, 11.1, 12.0, 13.0, の 8 つの緩衝液を作り之等を本法基礎液に加え、電解液量 5.05cc となし、Pol-

arogram を得た。その結果 Wolfe の述べた如く PH13 の強アルカリを加えた場合、最も美しい波型を呈する事を認めた。即ち 0.5n NaOH 1.0cc +  $H_2O$  2.0cc であつて、電解液 PH 5.1 であつて Wolfe- 本本法の電解液 PH 5.2 に極めて接近せる PH 値であつた。第 1 図(2)がその Polarogram である。

有機化合物の電極反応には殆んどの場合水素イオンが直接に関係するから、電極界面の水素イオン濃度を一定に保つために緩衝溶液を用いるが、この緩衝溶液の構成分質の濃度は、その緩衝能を大きくする意味から言つて成る可く高い方が望まれる。著者は androsterone 0.1mg 含有する基礎液に緩衝液として 0.5n NaOH 1.0cc に水を 0cc, 2.0cc, 4.0cc 3 つの添加した電解液について Polarogram を作り、第 1

図(1), (2), (3)に之を示した。之により水を添加するに従ひ波高の低い事を知った。即ち NaOH 濃度に従ひ、波高に高低を生ずる事を示して、Polarogram においては感度を高くすると波形の傾斜が急となり、波高測定に誤差を生じやすく、そのため感度を下げ美しい波形で、且つ波高の高い波を得る事が望ましい。以上の結果より 17-KS の Polarogram は Wolfe の報告していると同様、緩衝液の PH は強アルカリの場合で、電解液 PH 5.2 前後に於て満足な波が得られ、而も添加 0.5n NaOH の濃度が高い場合により高い波形を得る事を知り、著者は更に 0.5nNaOH, 1.0n NH<sub>4</sub>Cl, H<sub>2</sub>O を量的に種々の組合せを行い、電解液 PH 4.2 ~ 7.4 において Polarogram を得、これらについて半波電位、波形、波高について検討を行つて第 6 図に示した。第 6 図において、Wolf-

第 6 図

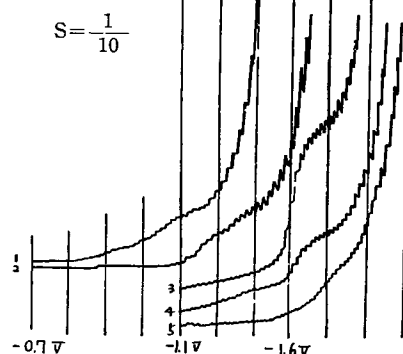


No.	1nNH <sub>4</sub> Cl	0.5nNaOH	H <sub>2</sub> O	PH
1	1.0cc	0.8cc	2.2cc	4.2
2	1.0	1.8	1.2	4.4
3	1.0	1.0	0	5.0
4	1.2	1.6	1.2	5.0
5	1.0	1.0	2.0	5.1
6	1.0	1.0	4.0	5.2

7	Wolfe 木本法			5.2
8	1.0	1.2	1.8	6.2
9	1.0	1.0	2.0	7.4

e- 木本法 (7) を中心として観察すると、それより PH7 に向うに従ひ波の出現が -1.4V より遅れ、逆に PH4.2 に向うに従ひ波の出現が -1.4V より早くなる。即ち PH により半波電位の移行する事が判る。第 1 図においても同様の事が認められる。第 7 図は緩衝液に強酸及び強アルカリ、中性の 3 者を本法、Wolfe- 木本法、と比較した場合を示す Polarogram であつて、半波電位の移動を更に明瞭に認め得るものである。波形は (3), (4), (5), (6), (7) はほぼ同様の形を呈し、(1), (2), (8), (9) においては波形の傾斜が前者等に比し急であり、波高においては (8) が最高の波高を示し、(6), (7) が美しい波形ながら余りにも他に比し低い波高の波を呈している。

第 7 図 androsterone 0.1mg

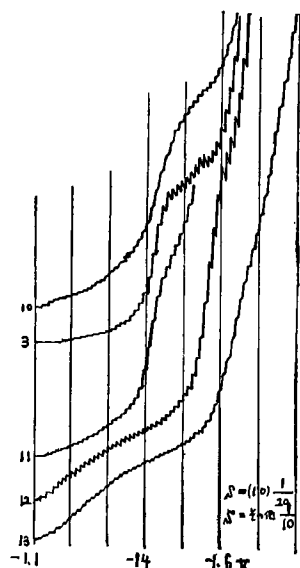


No.	0.4nHCL	0.5nNaOH	H <sub>2</sub> O
1	3.0	(-)	(-)
2	(-)	(-)	3.0
3	(-)	1.0	(-)
4	Wolfe—木本法		
5	(-)	2	1

著者は以上より波高、波形、半波電位及び Polarograph 的操作に簡便なる事を考え合せて、Wolfe の報告した -1.44V より還元波は早く、約 1.35 ~ -1.37V に出現し、Girard

T の波は  $-1.55$  以下に出現する第 6 図(3), 即ち前述せる本法を選び, 更に  $0.5nNaOH$  の量的変化による波の差を比較して第 8 図に示した。

第 8 図 androsterone 0.05mg



androsterone 0.05mg

No	$1.0nNH_4Cl$	$0.5nNaOH$	$H_2O$
10	1.0	0.8	(-)
3	1.0	1.0	(-)
11	1.0	1.2	(-)
12	1.0	1.5	(-)
13	1.0	3.0	(-)

これにより  $0.5n NaOH$  が  $1.0cc$  より少い時は波高は低く, 多い時は波高は高く変化するが, そのいずれもが波高測定に不適当と思われ, (3)を適当と認めた. 更にこの方法による Polarogram の波高と水銀柱との関係の比較を行った. 即ち健康成人尿より抽出した尿エキスを本法にて Polarogram をとり, その際の波高と水銀柱の高さの関係を検討し, 波高は水銀柱の高さの  $1/2$  乗に比例する事より Kinetic current の含まれていない事を認めた.

Polarograph 法を比色法と比較すると, 抽出法及びエーテル抽出物を更にアルコール抽出

を行わねばならぬ事等, 前述せる如く, 操作が複雑である他 Polarograph 的操作は常に一定温度にて測定せねばならぬ不便があるが, 本法は電解電流を自記せしめるものであるから, 記録を永久に保存する事が出来, 亦反応処理物は極めて安全で同一被検液につき定量を 24 時間後に反覆しても, 波形, 波高に変化を見ないという利点があり, 比色法における発色する反応時間, 呈色後に吸光度を読み取る迄の時間が数値に影響する事, 亦 Fraser の補正式を使用せねばならぬ等の必要は本法にはない Barnett (1946 年) 等は Polarograph 法と, Callow の比色法による 17-KS 定量結果を比較し (第 5 表), 比色法が高値を示し, 標準偏差も大であると述べており, その理由については言及していないが, 比色法においては色素及び水解人工産物等による干渉ではないかと述べ木本はこの点よりしても Polarograph 法は尿中 17-KS に全く特異的定量法といえたと述べている.

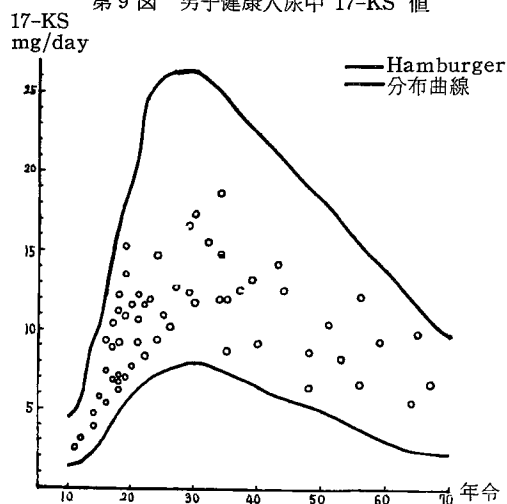
著者は Wolfe により提唱されて以来, Barnett 木本等により改良が加えられ, 臨床的に応用せられて来た 17-KS Polarograph 的定量法で, これ等の方法を基礎にして, 更に簡略化して, アルコール抽出乾固物の Girard T 試薬添加液の全量を活用し, Polarograph 的操作において  $NH_4Cl$ ,  $NaOH$  の濃度, 添加量良工夫を加え, 試料  $20cc/1$  日尿量より尿中 17-KS の Polarograph 的定量を行い得る様改にした.

健康人の 17-KS の尿中排泄量は従来幾多の報告があつて, 年令的変動, 日時期的変動, 民族による相違等その値には可成りの差異があり, 同一年令群内においても排泄量の動揺幅は可なり大きい事が知られている. それ故に正常排泄量の限界を何所に置くかが問題であるが, 大野は自己の測定経験より  $5mg \sim 16mg/day$  を正常範囲とし,  $5mg$  以下,  $25mg$  以上を略々病的値と決めている. Hamburger (1948 年) は第 9 図の如く, 正常人の尿中 17-KS 排泄量分布図を報告している.

第 5 表

報 告 者	測 定 法	♂			♀		
		年 令	例 数	17-KSmg/day	年 令	例 数	17-KSmg/day
Callow	Callow	20~40	20	5.4 ~21.2	20~40	19	5.1 ~14.2
Kenigsberg	Drekter	17~34	53	11.0 ~27.0	17~64	20	7.0 ~14.0
Barnett	Callow	20~22	8	11.9 ~23.4	18~37	20	5.3 ~18.0
	Poarograph	20~22	8	12.4 ~26.2	18~37	20	6.2 ~22.6
Harold	Haltorff-Koch	20~59	49	4.0 ~24.0			
三 宅	三 宅 改 良 法	20~59	64	8.3 ~21.5	20~49	48	5.0 ~15.7
大 野	Drekter-大 野	18~45	15	5.28~16.7	18~45	24	4.68~14.6
増 田	Haltorff Koch	17~49	24	6.1 ~24.0	17~49	15	6.0 ~11.1
ト 部	三 宅 改 良 法	20~49	47	7.01~21.2	20~49	18	4.2 ~13.8
木 本	Polarograph	8~16	27	2.0 ~ 8.5	8~16	25	2.5 ~7.5
		17~38	10	9.5 ~15.3	17~38	10	5.2 ~15.2
玉 置	Polarograph	16~49	45	5.4 ~1.87			
		10~15	5	2.6 ~ 5.7			
		50~69	8	5.5 ~12.1			

第 9 図 男子健康人尿中 17-KS 値



著者は本法により測定した58例の健康成人男子17-KSの1日排泄量は第3表に示し、第9図に分布図を示した。Hamburgerの分布図にあてはめた場合、その総てが範囲内にあり、30才~40才の値は低値に偏位している観を呈している。従来米英人と本邦人との測定成績を比較すると、差異ある事は認められており、教室ト部は成人男子に就てその平均値に於て3~5mg

の差があると述べている。

この成績を諸家の報告と比較した場合を第5表に示した。三宅、増田、大野、ト部等の比色法による数値と比較すると、特に著明な差が認められない。比色法のKenigsberg, Barnett及びPolarograph法によるBarnettの値に比較すると低値を示しており、Polarograph法による木本とは概ね一致した値を示している。これ等の相違は民族、測定方法、例数、或は補正式使用等により生ずるものと考ええる。

尿中17-KSの正常値の決定は先に述べた如く困難な事であるが、著者は文献に挙げられた他法に基く健康人値と比較し、本法が測定上充分価値のある事を認め、第6表に示す健康人値を以て本法における正常値と考え、臨床的応用への標準とした。

## V 結 語

- (1) 著者はWolfeの方法により、尿中17-KSをGirard T試薬と反応せしめ、之を電解還元可能なるGirard誘導体となしPolarograph法により尿中17-KSを定量した。
- (2) Polarograph的尿中17-KSの測定試料

として著者は成人 1 日尿中 20cc を用い, Polarogram が試料尿 10cc 相当量中の 17-KS の波を作製し得る如く, 測定方法を改良した.

(3) Polarograph 的操作に際し, アルコール乾固物 + Girard T 試薬 + 水 1.0cc の全量を使用し, 更に  $1.0n\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0cc,  $0.5n\text{NaOH}$  1.0cc を加え, Polarogram を得る様, 従来の Polarograph 的操作に工夫検討を行い, その方法を簡略化した.

(4) 抽出方法中, 洗滌法に Barnett の考案せる  $9\%\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液,  $10\%\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot 10\%\text{NaOH}$  液による洗滌法を取入れ好結果を得た.

(5) 著者は androsterone 標準液を使用し, 標準体添加法を用い, 校正曲線を作製し, それを以て標準曲線となし, これより 17-KS 量を

換算し, 1 日排泄量を求めた.

(6) 健康男子 10才 ~ 69才 58例について 17-KS 1 日排泄量を測定した. 16才 ~ 49才 45例の分布範囲は  $5.4\text{mg} \sim 18.7\text{mg/day}$  であつた. 各年齢群に区分し分布範囲, 平均値, 標準偏差を求め, その値を以て, 本法による 17-KS 1 日排泄量の標準値とした.

本論文の要旨は日本泌尿器科学会第 44 回総会にて発表し, 尚その後追加実験を行い, 第 10 回日本泌尿器科学会中部連合地方会にて発表した.

擱筆するに当り御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜りました恩師稲田教授に衷心より感謝いたします.

試薬を提供して頂いた 帝国臓器に感謝いたします.

文献は最終篇に記載する.